



北海道公立大学法人
札幌医科大学
Sapporo Medical University

SAPPORO MEDICAL UNIVERSITY INFORMATION AND KNOWLEDGE REPOSITORY

Title 論文題目	More potent suppression of interferon-related antiviral activities by measles virus wild strains than laboratory strains. (麻疹ウイルス野外株は実験室株よりも宿主インターフェロンによる抗ウイルス活性をより強力に抑制する。)
Author(s) 著 者	地主, 勝
Degree number 学位記番号	甲第 2830 号
Degree name 学位の種類	博士 (医学)
Issue Date 学位取得年月日	2015-03-31
Original Article 原著論文	
Doc URL	
DOI	
Resource Version	

学位論文の内容の要旨

報 告 番 号	甲第 2830 号	氏 名	地主 勝
<p>論文題名</p> <p>More potent suppression of interferon-related antiviral activities by measles virus wild strains than laboratory strains. (麻しんウイルス野外株は実験室株よりも宿主インターフェロンによる抗ウイルス活性をより強力に抑制する。)</p> <p>研究目的</p> <p>麻しんウイルス (MeV) による宿主細胞の抗ウイルスシステムからの回避ストラテジーについての報告は我々の研究も含め多数ある。これらの報告では実験室株や限られた数の野外株しか用いられておらず、複数の野外株を用いて比較した報告はなく、抗ウイルスシステム抑制活性が MeV 一般に認められるものなのか、病原性とどのような関連があるのかは明らかでない。そこで今回、野外株の遺伝子型 D3、D5、D8、H1 および実験室株 Edmonston を用いて MeV 感染誘導性及びインターフェロン (IFN) 誘導性の宿主抗ウイルス因子 IFN-simulated genes (ISGs) 発現誘導が遺伝子型により異なるのかを評価した。</p> <p>研究方法</p> <p>ウイルスは MeV 野外株[遺伝子型 D3 (AK1 株)、D5、D8、H1]及び実験室株[遺伝子型 A ; Edmonston]を使用し、これらのウイルス株を SiHa 細胞 (子宮頸がん由来上皮系細胞株) に感染させた持続感染細胞株を樹立して実験に用いた。(以下、SiHa-D3 (遺伝子型 D3 感染)、SiHa-D5 (遺伝子型 D5 感染)、SiHa-D8 (遺伝子型 D8 感染)、SiHa-H1 (遺伝子型 H1 感染)、SiHa-A (遺伝子型 A ; Edmonston 感染) とする。)</p> <p>各細胞株における MeV の持続感染は、免疫蛍光染色法及び RT-PCR 法により確認した。また、これら細胞が産生するウイルス量とウイルスタンパク質発現をプラーク形成法、Western blot 法でそれぞれ測定した。</p> <p>MeV の V 及び C タンパク質の細胞内局在を免疫蛍光染色法により観察した。さらに、ストレスグラニュール (SG) のマーカーである GTPase activating protein (SH3 domain) binding protein 1 (G3BP1) を同時染色により観察し、C タンパク質との関連性について検討した。</p> <p>各持続感染細胞を IFN-α、IFN-γ、IFN-λ で刺激後、4 及び 8 時間後の ISGs[MxA、2,5-オリゴアデニル酸合成酵素 (2,5-AS)、interferon regulatory factor 1 (IRF-1)]の</p>			

発現を real-time PCR にて測定した。

持続感染細胞における MxA 遺伝子の誘導とウイルス量の関連性について、SiHa-H1 を用いて MxA 遺伝子の siRNA トランスフェクションによるノックダウンを行い産生ウイルス量の変動を測定した。

研究成績

各持続感染細胞上清中のウイルス量は、SiHa-D3 ($9.3 \pm 3.5 \times 10^5$ PFU/ml)、SiHa-D5 ($7.4 \pm 2.6 \times 10^4$ PFU/ml)、SiHa-D8 ($1.9 \pm 0.2 \times 10^4$ PFU/ml)、SiHa-H1 ($7.5 \pm 0.6 \times 10^3$ PFU/ml)、SiHa-A ($8.6 \pm 1.6 \times 10^2$ PFU/ml)の順に多く、遺伝子型によって異なっていた。また、ウイルスタンパク質の発現量は、N、M、P、V タンパク質では遺伝子型による顕著な差を認めなかったが、C タンパク質の発現量は細胞株によって異なり、ウイルス量と逆相関の傾向を認めた。

各持続感染細胞における V 及び C タンパク質の局在を蛍光免疫染色法で観察した。V タンパク質は全ての持続感染細胞において細胞質、特に細胞膜側に多く発現が認められた。一方、C タンパク質は SiHa-D3、SiHa-D5、SiHa-D8 の細胞質において顆粒様に認められたが、SiHa-H1 及び SiHa-A では確認できなかった。また、ウイルス感染によって誘導される SG と、C タンパク質の共局在は認められなかった。

ISGs のうち MxA 及び 2,5-AS は、IFN 非刺激下でも MeV 感染によって発現が誘導されており、各細胞における発現量は細胞上清のウイルス量と負の相関を認めた。IFN- α 、- λ 刺激により非感染細胞では著明な ISGs の発現誘導が認められるのに対し、すべての感染細胞株で刺激による発現上昇は認められなかった。一方、IRF-1 は IFN 非刺激下でも MeV 感染によって、他の ISGs に比較して有意だが低い発現上昇が認められた。IFN- γ による IRF-1 の発現誘導は各細胞株で認められたが、それらの発現上昇割合は非感染細胞に比較して D3 以外の感染細胞株では約 1/2 から 1/3 に、D3 感染細胞株では約 1/8 に減弱していた。

SiHa-H1 の MxA 遺伝子を siRNA でノックダウンすることにより、細胞上清中のウイルス量はわずかではあるが有意に増加した。

考察及び結論

我々のこれまでの研究で実験室株に比べ、野外株 (AK1 株: D3) の感染細胞における C タンパク質の発現量が極めて高いことを明らかにしているが、本研究では、野外株でも遺伝子型の違いにより ISGs の発現誘導、ウイルス産生量、C タンパク質発現量に差異があることを初めて明らかにした。また、ISGs の誘導量と C タンパク質の発現量に負の相関を認めることから、遺伝子型の違いによる ISGs の誘導抑制が C タンパク質と関連している可能性が示唆された。

MeV 感染細胞の細胞質において、C タンパク質が顆粒様に局在するのを認めた。同

様の顆粒様の形態をとる物質としてウイルス感染や2本鎖RNAにより誘導されるSGがある。しかし、MeV 持続感染細胞においてはSGの形成を認めず、さらにCタンパク質とSGのマーカータンパク質の局在が一致していないことから、両者の関与は極めて低いことが示された。

ISGsの発現には、IFN刺激による発現誘導とMeV感染で起きるIFN非依存的と考えられる発現誘導の存在が示唆された。IFN- α 、- λ によるISGs発現誘導は野外株、実験室株を問わずMeV感染細胞でほぼ完全に抑制されていた。一方で、MeV感染で誘導されるISGs発現はMeV株によって多様性を示し、実験室株が最も高く、野外株D3が最も低かった。さらにMeV感染誘導性のISGsの発現量とウイルス産生量に負の相関を認めた。誘導されたISGsが実際にウイルスの産生を抑制しているかについて、MeV持続感染細胞間で特に発現量に差の認められたMxA遺伝子についてノックダウンを行ったところ、ウイルス産生量がわずかではあるが有意に増加した。宿主細胞にはIFN刺激やウイルス感染によって誘導される2,5-ASなど他の様々な抗ウイルスメカニズムが存在しているので、それらの影響によりMxAのみのノックダウンではウイルス産生量の増加がわずかであったと考えられる。しかしながらMeV感染によって誘導されるISGsはMeVの増殖、ウイルス粒子の産生の抑制に寄与しているものと考えられる。一方、IRF-1に代表されるIFN- γ 刺激による発現誘導系のMeV感染による影響もIFN- α 、- λ に比較すると小さいが、抑制される傾向にあった。その抑制はD3で特に顕著であった。

以上のことから、IFN非依存的に、MeV感染で誘導される抗ウイルス効果を抑制することは、効果的なウイルス増殖に必要であることが示唆された。野外株によるMeV感染誘導性抗ウイルス効果の抑制は実験室株のそれよりも強く、野外株の高病原性の要因のひとつであると考えられる。一方で、抗ウイルス効果抑制活性の消失が実験室株の弱毒性に関与していると考えられる。さらに、MeV感染誘導性抗ウイルス効果の抑制活性は野外株の遺伝子型により異なっており、遺伝子型D3、D5、D8、H1の順に高いことが示された。

論文審査の要旨及び担当者

(平成 27 年 3 月 31 日授与)

報告番号	甲第 2830 号	氏 名	地主 勝
論文審査 担 当 者	主査 教授 横田 伸一	副査 教授 小林 宣道	
	委員 教授 堤 裕幸	委員 教授 氷見 徹夫	

論文題名	More potent suppression of interferon-related antiviral activities by measles virus wild strains than laboratory strains.
<p>結果の要旨</p> <p>本研究は遺伝子型の異なる麻疹ウイルス株で感染性ウイルスの産生量、インターフェロン情報伝達系への影響を検討したものである。複数の野外株での比較検討はこれまでなく、株間の差異が認められたことから、麻疹ウイルスの病原性、ワクチン株の弱毒化メカニズムを知るための基礎知見として重要な研究と位置づけられる。以上のことから、本論文は博士（医学）授与に値するものと認められる。</p>	